CORSO INTEGRATO DI GENETICA

a.a. 2011-2012

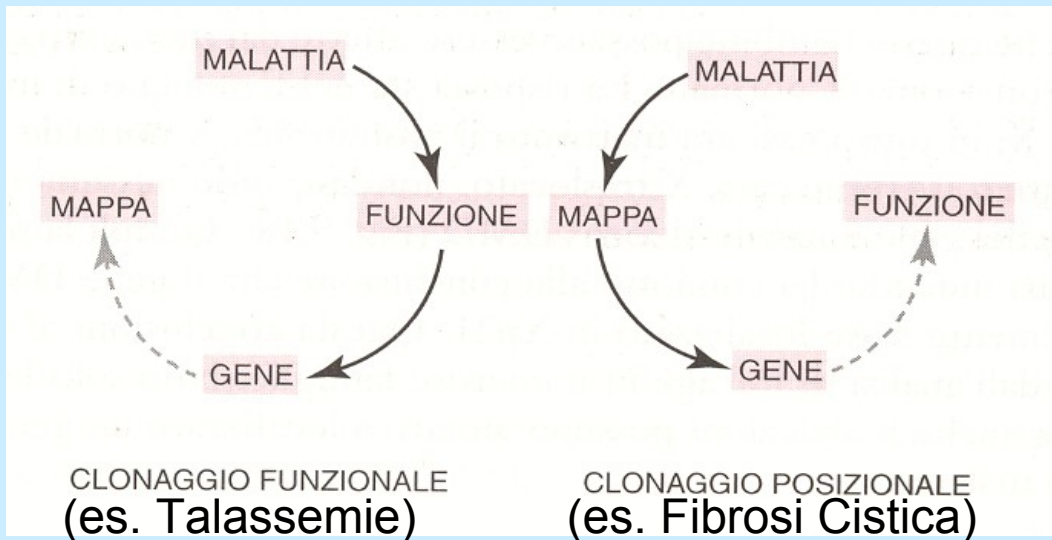
Talassemie

Fibrosi Cistica

6.12.2011

Cristina Bombieri

Identificazione di geni responsabili di malattie mendeliane

(es. Talassemie) (es. Fibrosi Cistica)

(Gelehrter, Collins, Ginsburg; Genetica Medica; Masson 1999)

OGGI

HGP

(Human Genome Project)

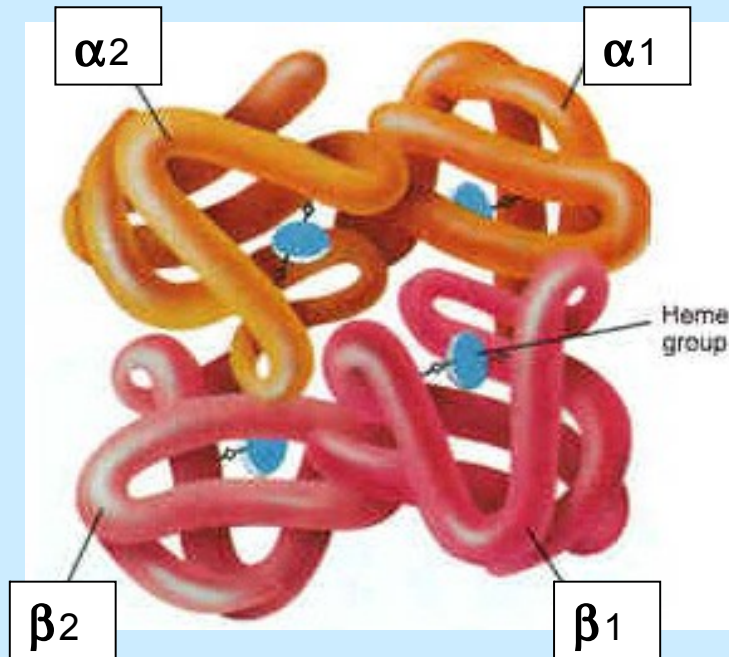
&

Exome sequencing

(ri-sequenziamento

regioni codificanti)

TALASSEMIE

L’emoglobina

Struttura della molecola

EMBRIONE (Sacco Vitellino)

FETO (Fegato)

ADULTO (Midollo Osseo)

ζ α

$\zeta_2\varepsilon_2$ $\zeta_2\gamma_2$ $\alpha_2\varepsilon_2$ $\alpha_2\gamma_2$ $\alpha_2\delta_2$ $\alpha_2\beta_2$

Gower 1 Portland Gower2 F A 2 A

ε γ δ β

Fig.2. Composizione delle emoglobine (Gower 1, Gower 2, Portland, F, A, A2) prodotte nell'uomo dall'embrione, dal feto e dall'adulto. Tra parentesi sono indicati i siti di eritropoiesi.

http://www.daviddarling.info/encyclopedia/H/hemoglobin.html; http://www.talassemiaricerca.unife.it/emoglobine.html

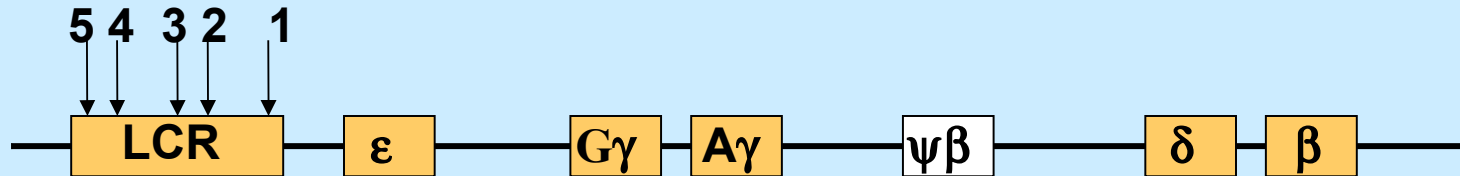
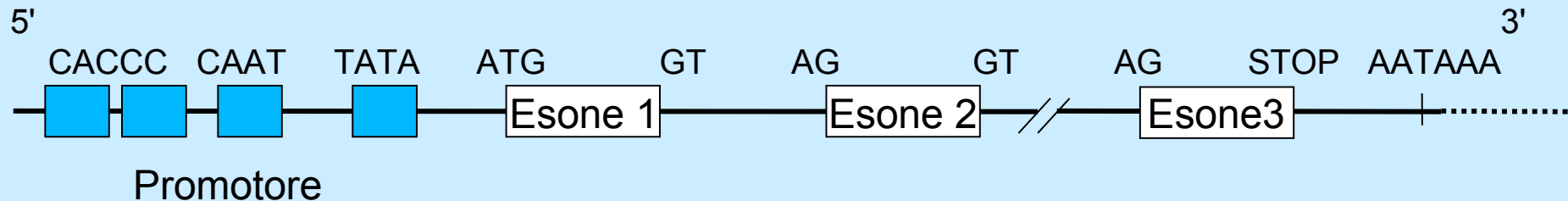
(Purves, Savada, Orians, Heller; Biologia – L'informazione e l'eredità; Zanichelli, 2005)

Ontogenesi emoglobina

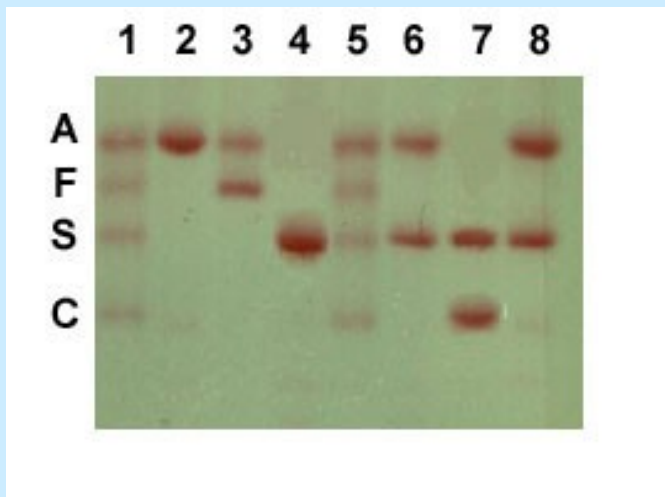
(Thompson and Thompson, Genetica in Medicina, Idelson-Gnocchi, 2005)

HS40 e Locus Control Region

Crom. 16, classe α

Crom. 11, classe β

Struttura di un gene globinico

Disturbi ereditari dell’emoglobina

- **Varianti strutturali (difetti QUALITATIVI):**

  emoglobina S (An. Falciforme), emoglobina C, … >200 varianti rare

1,5: marcatore peso molecolare
2: adulto normale
3: neonato normale
4: omozigote HbS, An. Falciforme
6,8: eterozigote HbS, portatore
7: eterozigote composto HbS/HbC

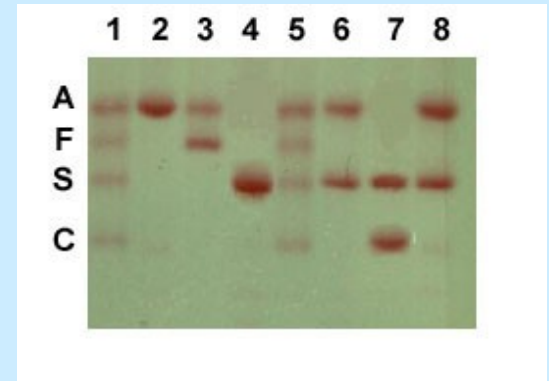
(http://web.indstate.edu/thcme/mwking/ hemoglobin-myoglobin.html)

FALCEMIA: Glu6Val; G**A**G > G**T**G

Le prime malattie molecolari descritte -> Genetica Medica

(Weatherall, Nat Rev Genet 2004; 5:625)

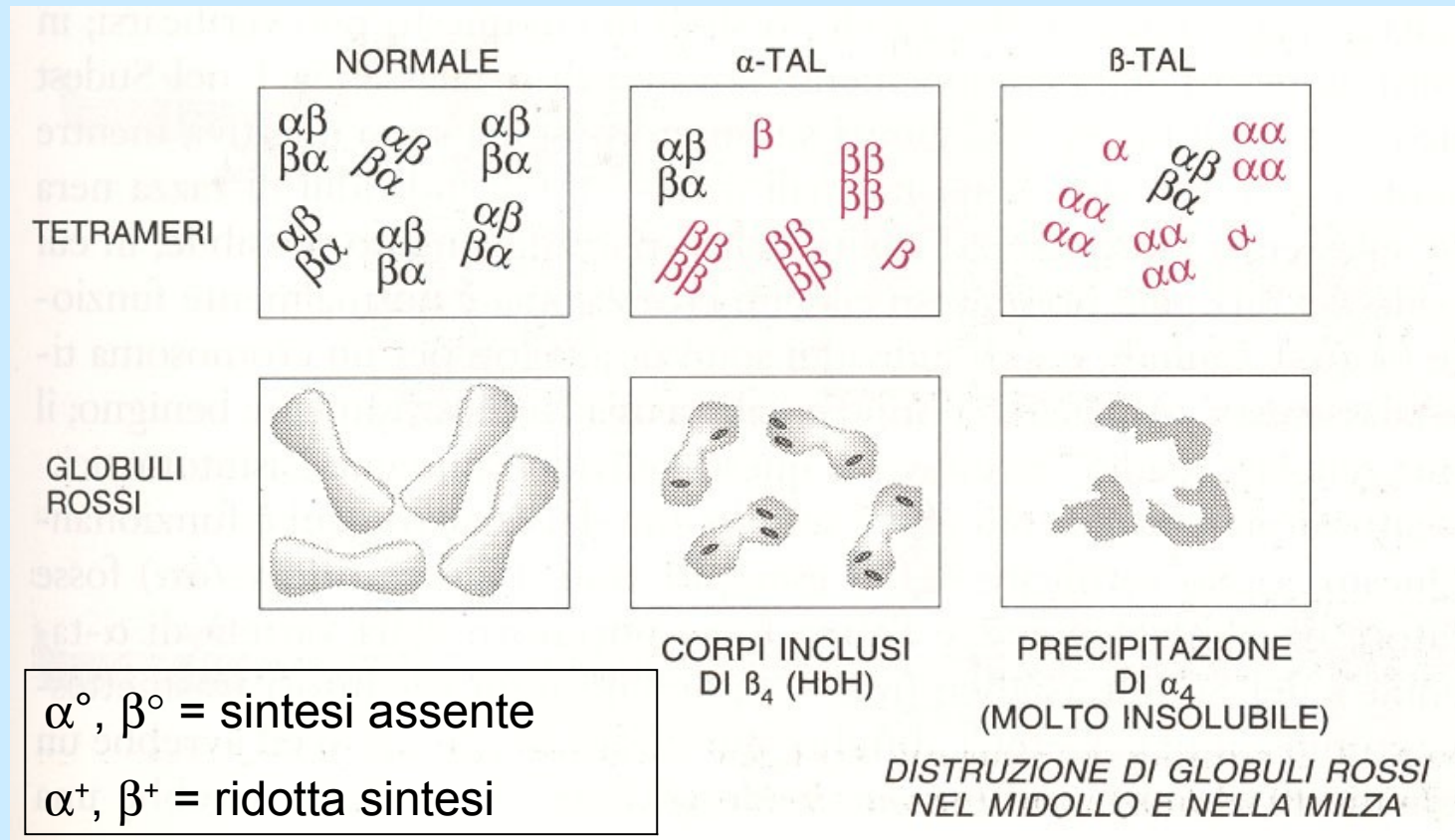
Disturbi ereditari dell'emoglobina

- **Varianti strutturali**
  (difetti QUALITATIVI)
  ES. HbS, Falcemia

- **DIFETTI QUANTITATIVI:**

  Talassemie: α, β, $\delta\beta$, δ, $\varepsilon\gamma\delta\beta$

  HPFH: Persistenza ereditaria di emoglobina fetale ($\alpha_2\gamma_2$)

Le prime malattie molecolari descritte -> Genetica Medica
(Weatherall, Nat Rev Genet 2004; 5:625)

Talassemie: alterato rapporto catene α/nonα

Anemia con microcitemia e riduzione numero e dimensioni dei globuli rossi

(Gelehrter, Collins, Ginsburg; Genetica Medica; Masson 1999)

Talassemie: terminologia clinica

- Major (maggiore), Grave, Trasfusione dipendente
  es. Morbo di Cooley (Thal β^0); Idrope fetale (Thal α^0);

- Intermedia, non trasfusione dipendente;
  - es. Thal β^+ con mutazioni lievi che conservano consistente produzione residua di catene beta
  - Thal β^+ / Thal α
  - Thal β + Mut $\uparrow\gamma$ (HPFH)

- Minor (minore): portatore, non affetto, “microcitemico”.

α Talassemia

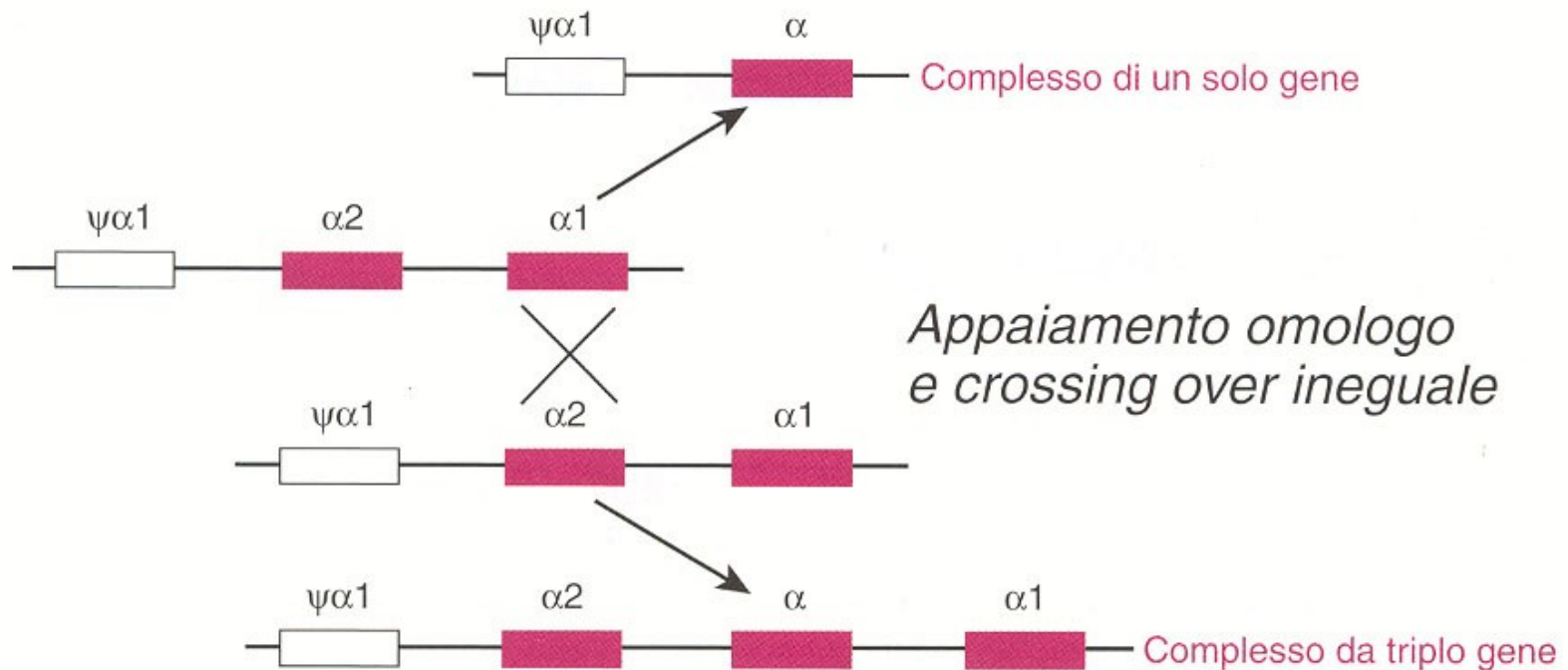
Ridotta o assente sintesi di catene α

Fenotipo (condizione clinica)	Numero di geni α-globinici funzionali	Genotipo	Produzione catene α
Normale	4	αα/αα	100%
Portatore silente	3	αα/α-	75%
Tratto α -talassemico (lieve anemia, microcitemia)	2	αα/-- α-/α-	50%
Malattia da HbH (β_4) - (anemia emolitica moderatamente grave)	1	α-/--	25%
Idrope fetale o α -talassemia omozigote (quasi sempre incompatibile con la vita; Hb di Bart: γ_4)	0	--/--	0%

HbH: tetrameri di catene β.

Idrope fetale, Hb Bart: tetrameri di catene γ; tessuti anossici, scompenso cardiaco, edema pervade tutti i tessuti (idrope fetale)

Delezione di geni α in seguito a crossing over ineguale

(Thompson and Thompson, Genetica in Medicina, Idelson-Gnocchi, 2005)

β Talassemia

- “Anemia Mediterranea” perchè diffusa più frequentemente nei paesi del Mediterraneo: Nord-Africa, Medio-Oriente, India, Asia centrale esudest Asiatico.
- Ridotta o assente sintesi di catene β
- Eterogena dal punto di vista molecolare
- Identificate >200 mutazioni che producono il fenotipo talassemico (sostituzioni nucleotidiche, piccole inserzioni o delezioni; meno frequenti le grosse delezioni):
  - Mutazioni β^0 : Causano assenza totale di produzione delle catene β
  - Mutazioni β^+: Causano riduzioni più o meno marcate nella produzione delle catene β

Patofisiologia della beta-talassemia

Ridotta o assente sintesi di catenedi classe β

Eccesso catene α

Catene α non formano tetrameri, ma si legano alla membrana dei GR e dei precursori danneggiandola, ad alte concentrazioni formano aggregati tossici

β^0/β^0 - TALASSEMIA MAJOR

(MORBO O ANEMIA DI COOLEY)

Si manifesta in genere entro i primi due anni di vita. Eritropoiesi inefficiente, anemia, ipertrofia del tessuto ematopoietico con deformazioni scheletriche, ipertrofia del fegato e della milza che si riattivano come organi ematopoietici

Talassemia major + HPFH

forma fetale persistente $\alpha_2\gamma_2$ (Hb F)

attenuazione fenotipo β talassemico

β^0/β^+ o β^+/β^+

TALASSEMIA INTERMEDIA

Quadro clinico più attenuato che compare nell'infanzia o anche più tardi, con anemia lieve o moderata, talvolta ritardi nella crescita e anomalie ossee.

Eterozigote $\beta^0/+$ o $\beta^+/+$

TALASSEMIA MINOR:

portatore sano o oligosintomatico; microcitemico

Mutazioni comuni per la beta-talassemia in Sardegna

Codone 39

…. Gene normale … CAG (Gln)

…. β°39 … UAG (stop)

95.7%

Mutazione 110 β^+ nel sito criptico accettore dell'introne 1 → Ridotto utilizzo del sito normale → Utilizzo preferenziale nel sito mutato (90%)

10%

Esone 1

Esone 2

Esone 3

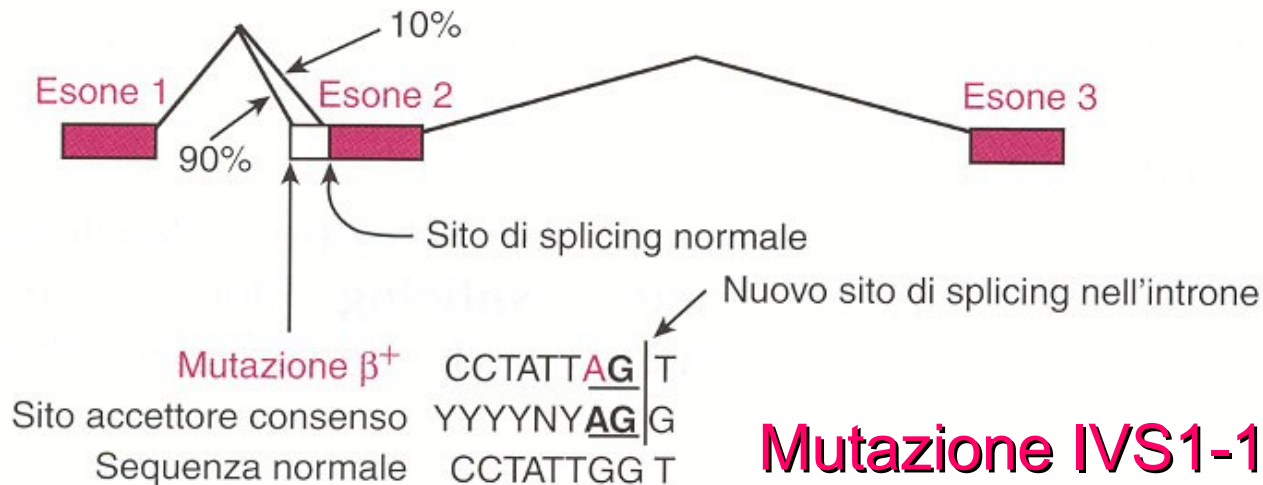
90%

Sito di splicing normale

Nuovo sito di splicing nell'introne

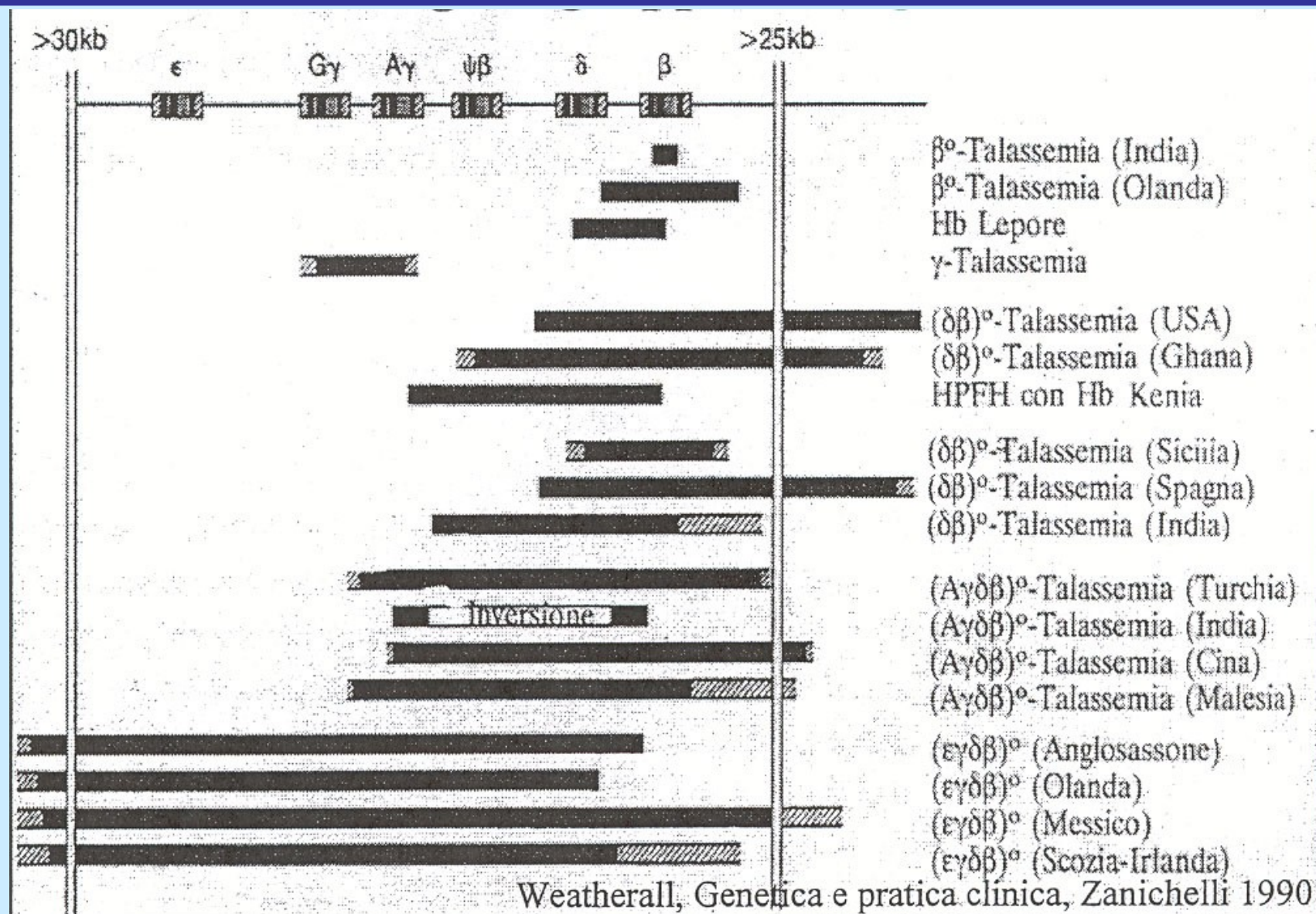
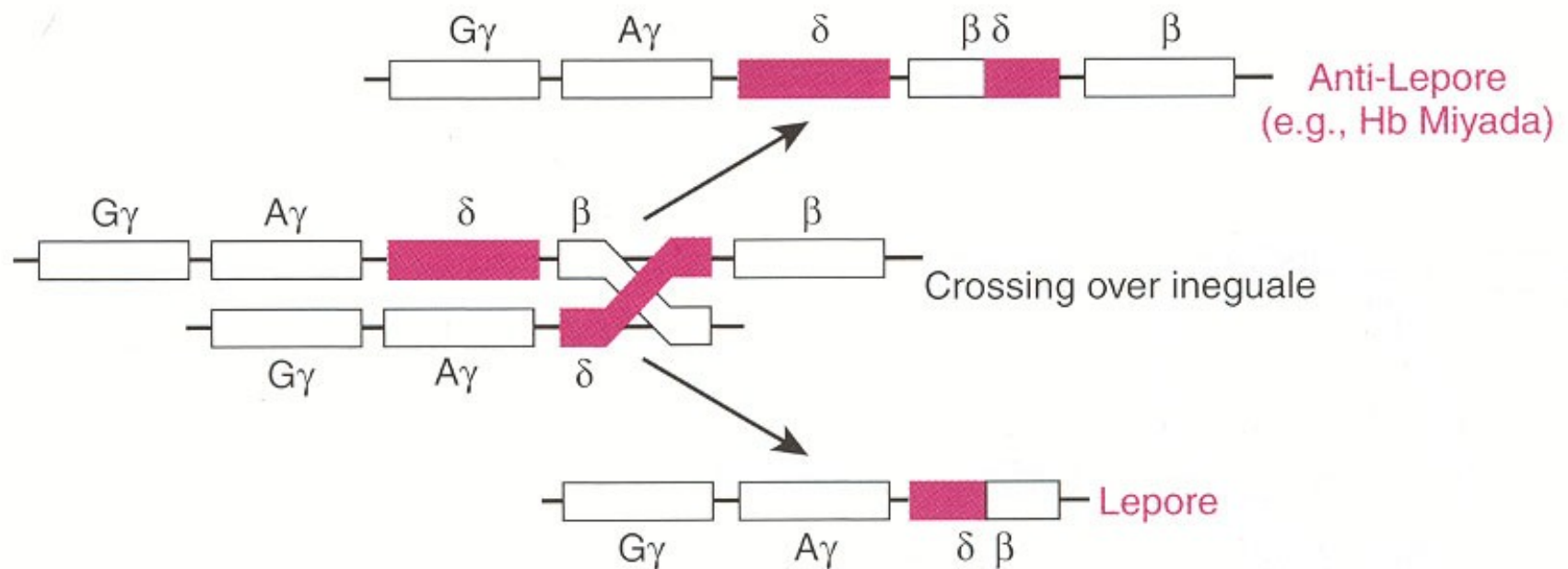
Mutazione β^+	CCTATTAG | T
Sito accettore consenso	YYYYNYAG | G
Sequenza normale	CCTATTGG T

Mutazione IVS1-110G>A

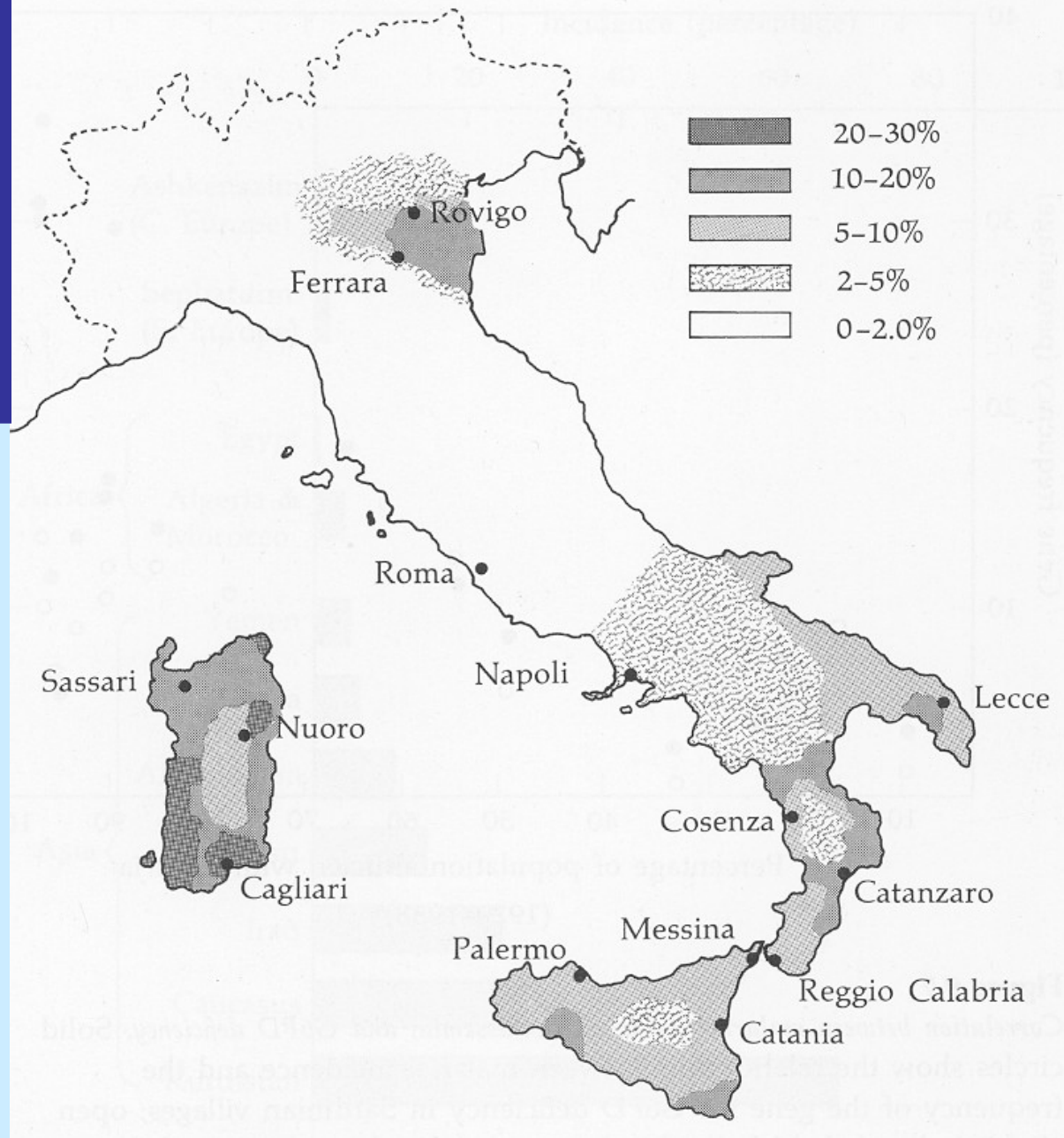
(Thompson and Thompson, Genetica in Medicina, Idelson-Gnocchi, 2005)

Delezioni geni gruppo beta globinici

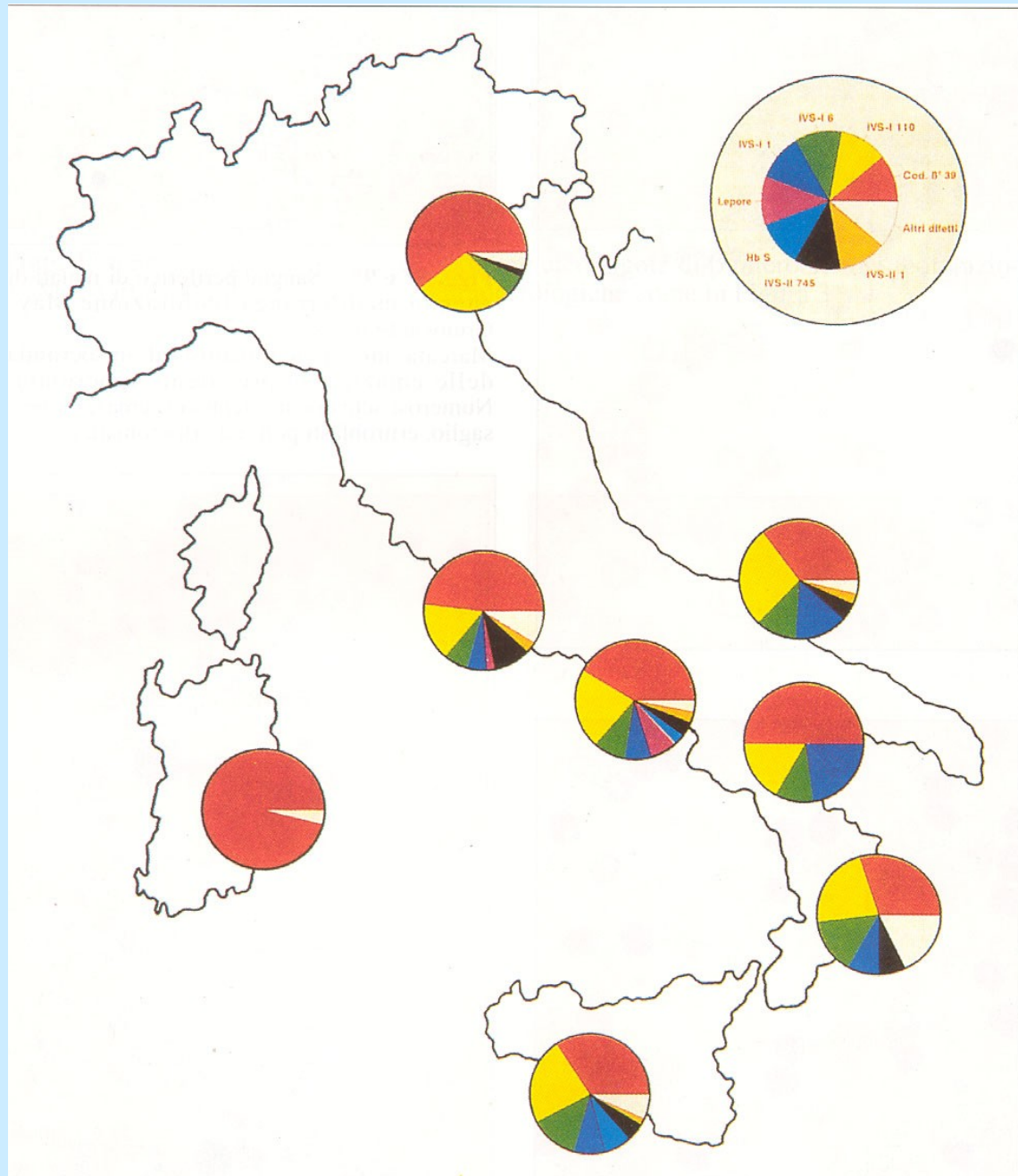
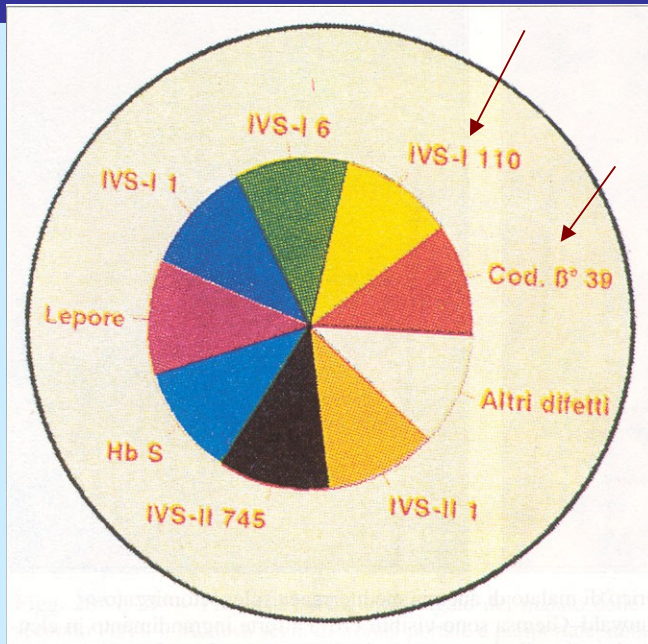
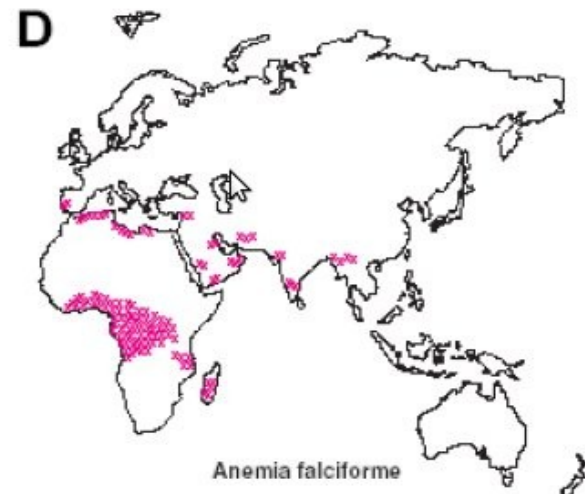
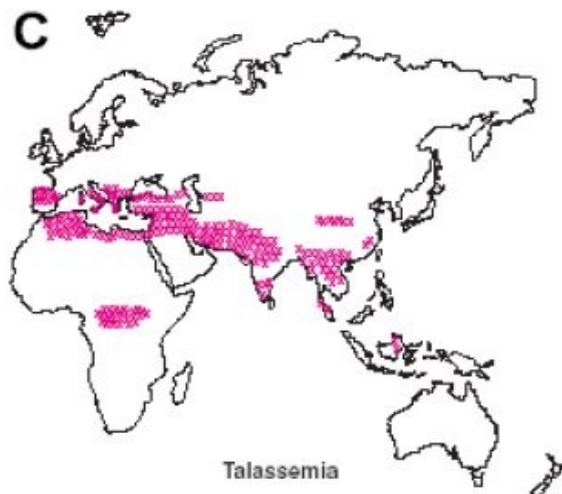
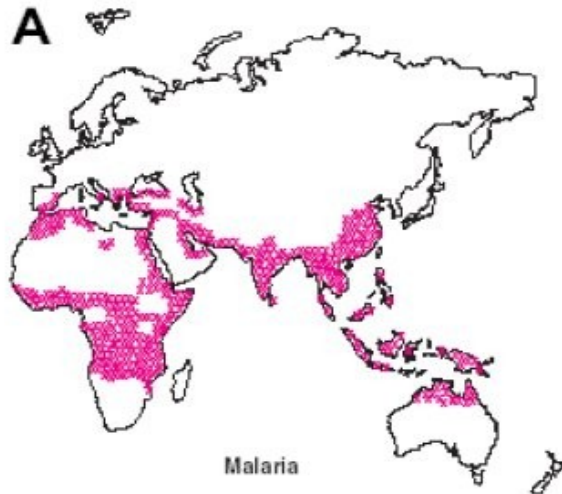
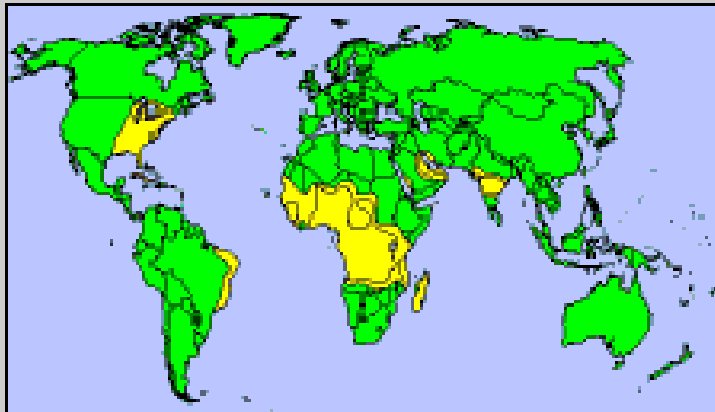
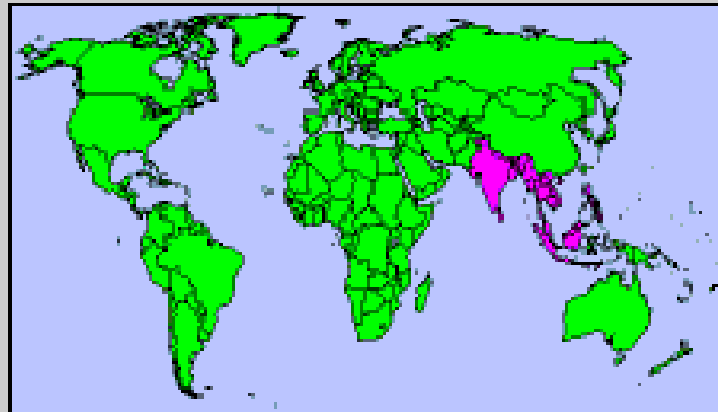
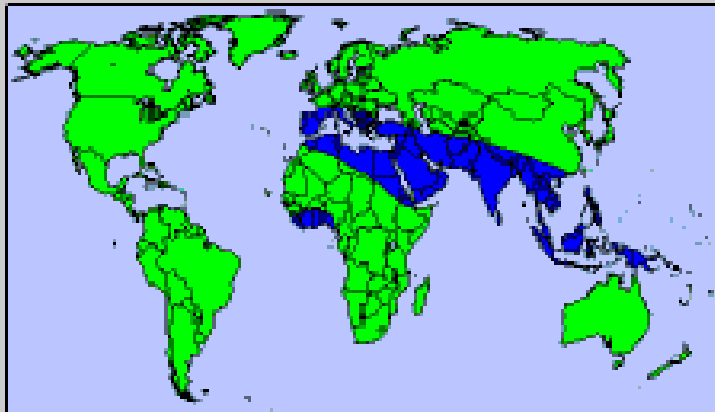
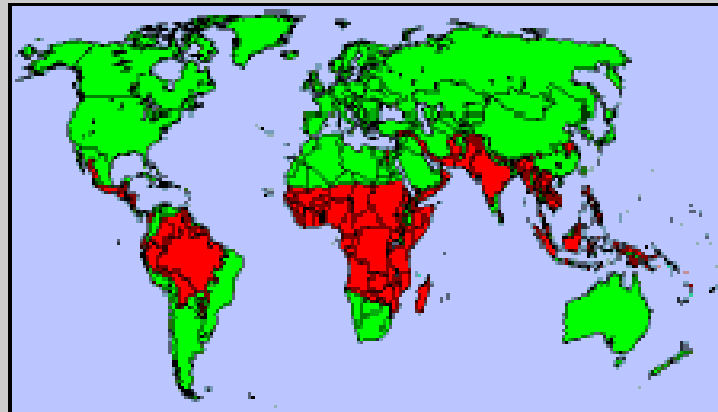
Weatherall, Genetica e pratica clinica, Zanichelli 1990

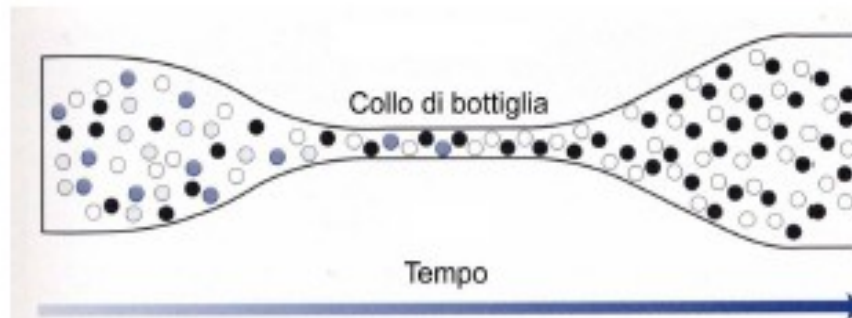
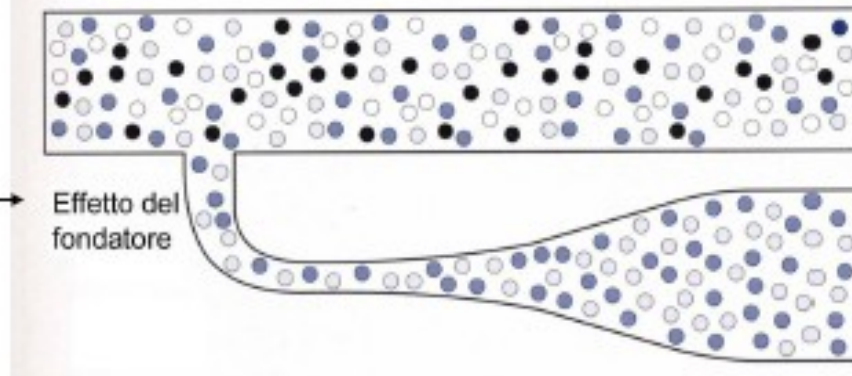
Emoglobina Lepore

(Thompson and Thompson, Genetica in Medicina, Idelson-Gnocchi, 2005)

Incidenza della β talassemia in Italia

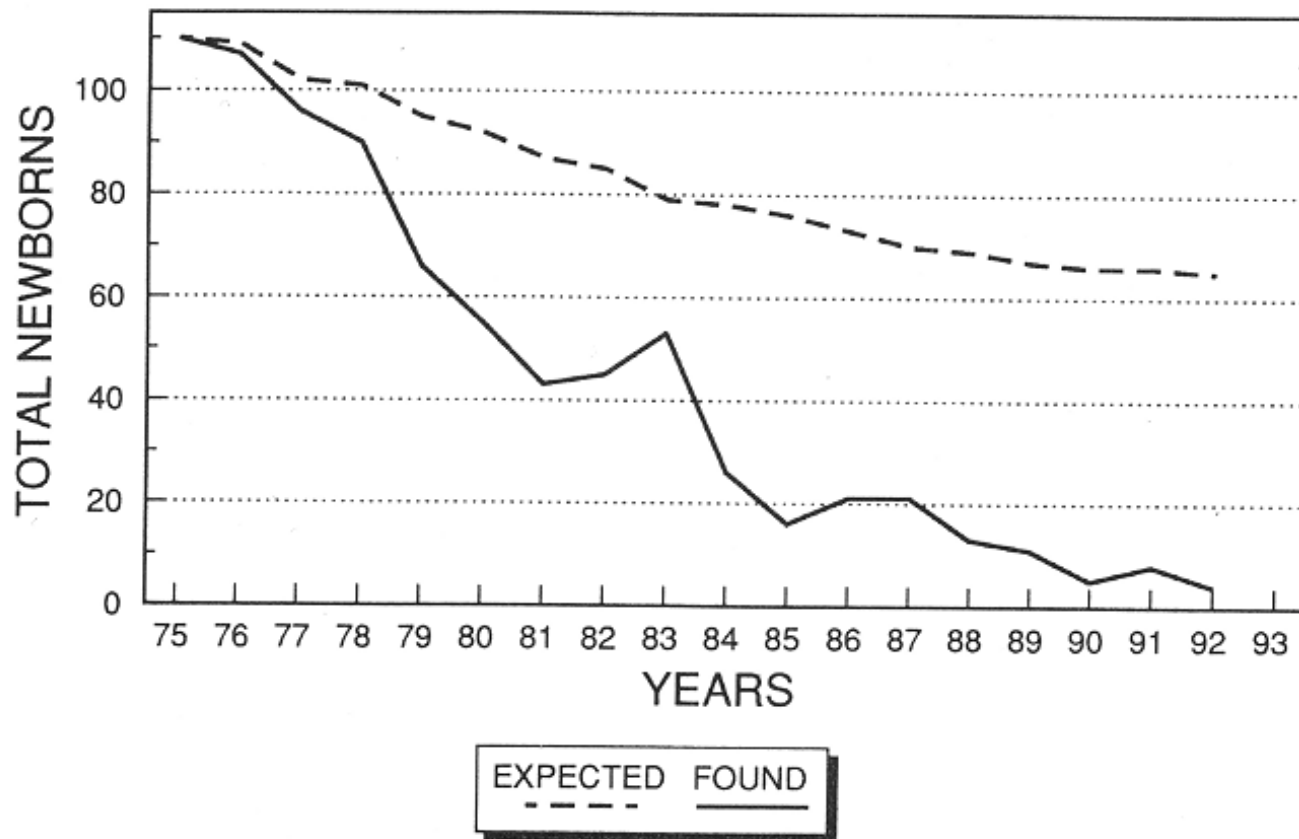
E' indicata la frequenza degli eterozigoti

Bodmer e Cavalli, Genetica Evoluzione Uomo, vol2, Mondadori 1977.

Frequenza di diverse mutazioni per la β talassemia in Italia

Bianco – Silvestroni; Le Talasemie; Ist It Med Sociale, 1998

Colocalizzazione di malaria e alcune emoglobinopatie

Malaria ed emoglobinopatie oggi

Effetto collo di bottiglia ed Effetto fondatore

A) Drastica riduzione della popolazione iniziale (in seguito ad eventi catastrofici)

B) Piccolo campione non rappresentativo del pool genico della pop. originaria

In entrambi i processi si verifica deriva genica

MA Jobling et al., Human Evolutionary Genetics, 2004, Garland Pub

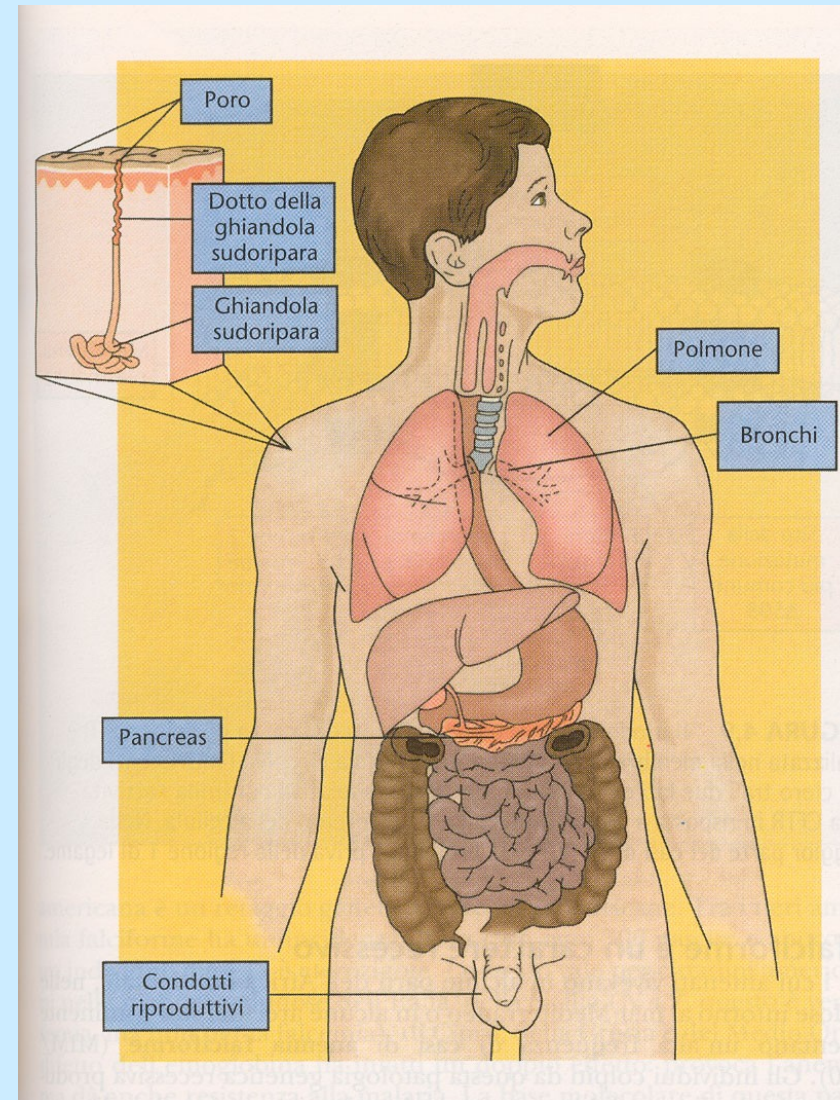
Diminuzione dei nati con Talassemia in Sardegna

Programma di screening dei portatori iniziato nel 1975

(Cao, Am J Hum Genet, 54:397; 1994)

FIBROSI CISTICA

Gli organi colpiti dalla FC

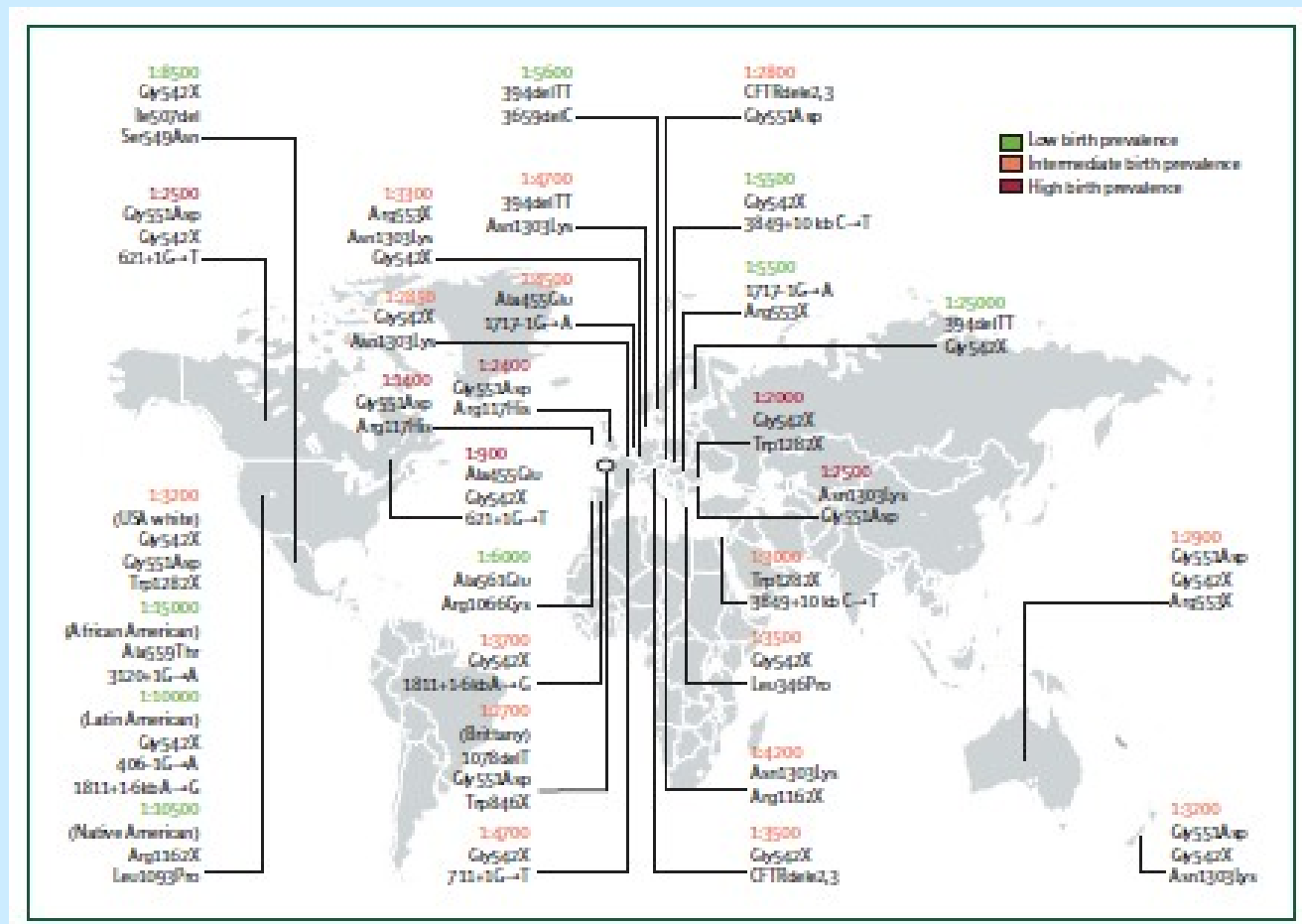
- Vie aeree: ostruzione e infezione, cause della maggior parte dei decessi
- Pancreas: occlusione dotti e insufficienti enzimi digestivi in 85% dei pazienti
- Intestino: occlusione fecale in 10% dei neonati
- Apparato riproduttivo: 95% dei maschi assenza dotti deferenti. Possibile tappo mucoso uterino
- Ghiandola sudoripara: eccesso di cloro nel sudore, test diagnostico fondamentale

(Cummings – Eredità – EdiSES, 2004)

Fibrosi Cistica

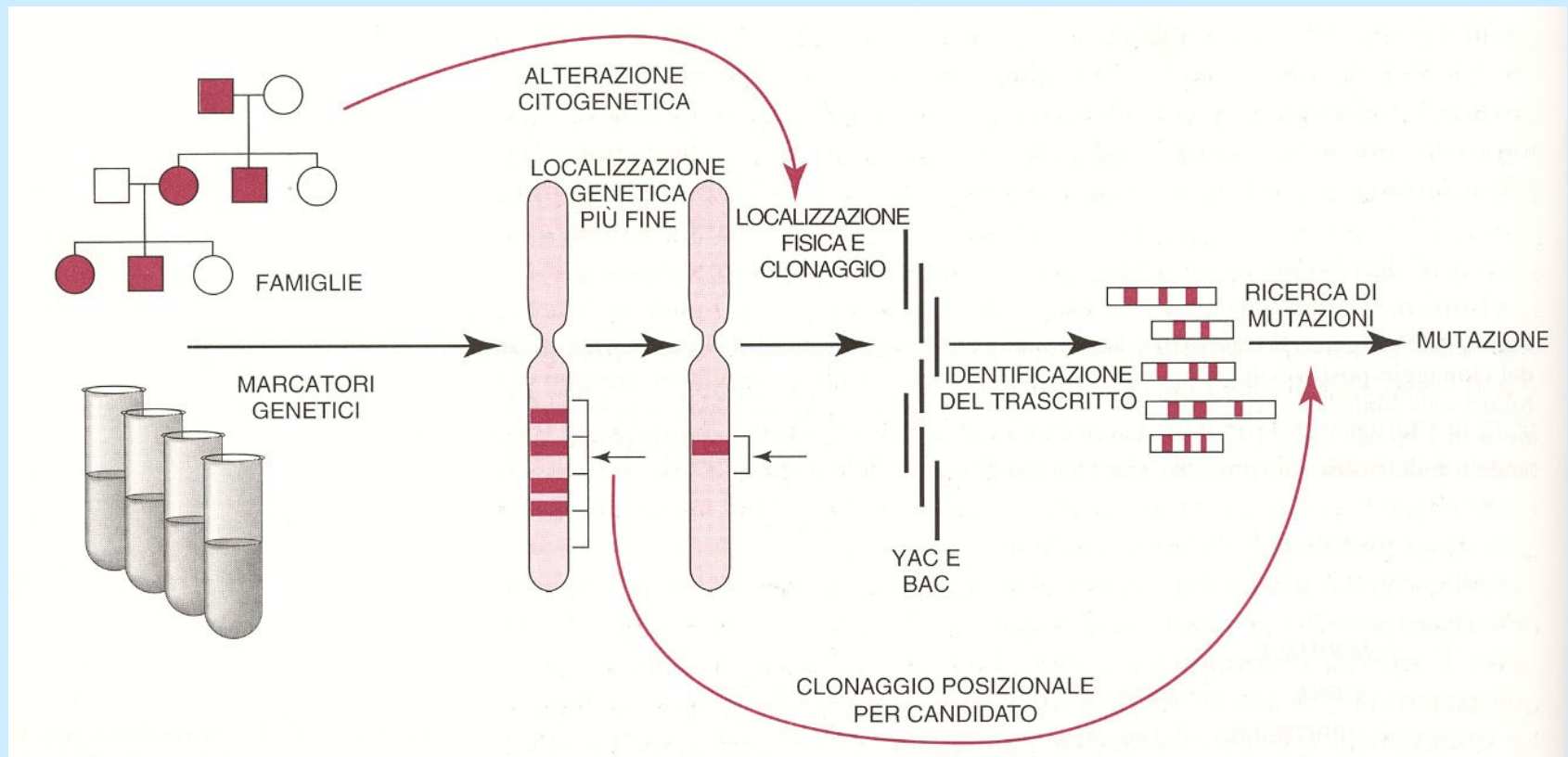
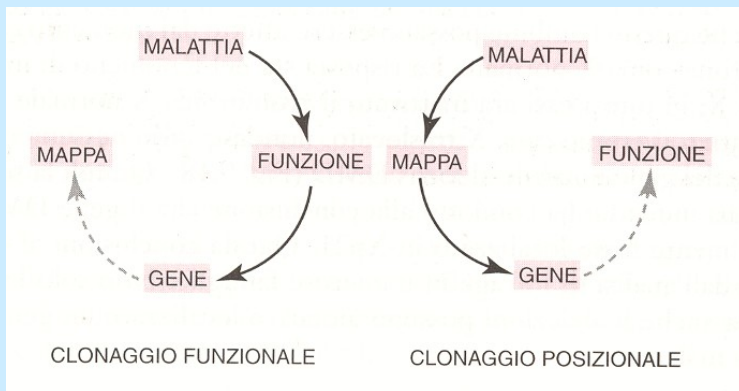
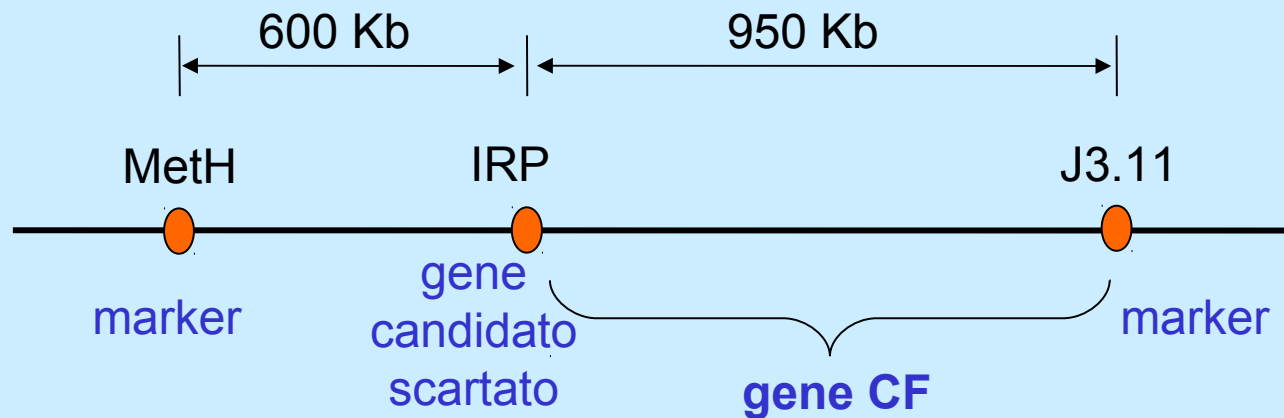
- Nati/anno: oltre 200
- Affetti circa 5000-6000 (40% adulti)
- Portatori: oltre 2.200.000
- (Nota: estrapolazioni dai dati di screening neonatale 1993-2000 nel Veneto-Trentino Alto Adige: incidenza osservata FC=1/2705 nati, frequenza dedotta portatori = 1/26,5)
- Sopravvivenza: mediana 30 anni
- Più comune malattia AR nelle popolazioni di origine caucasica (molto rara nelle altre popolazioni)
- Legge prevenzione e cura FC (screening e DP)

Incidenza della fibrosi cistica in diversi gruppi etnici:

- Europa 1/2500-3500 (Finlandia 1/15000)
- America (caucasici) 1/3300
- Afro-Americani 1/15300
- Ispano-americani 1/8-9000
- Asiatico-americani 1/32100
- ….

FC: incidenza e mutazioni comuni

INCIDENZA (alla nascita) = numero casi FC / totale dei nati vivi

Può variare anche di molto tra diversi gruppi etnici presenti in uno stesso paese (Lancet 373:1891-1904;2009).

Identificazione del gene CFTR mediante clonaggio posizionale

Clonaggio di posizione per la identificazione del gene della fibrosi cistica

- 1985: linkage al cromosoma 7
- 1987: errata identificazione del gene
- 1989: identificazione del gene CFTR

(Science 245: 1059, 1989)

Il gene e la proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator)

- Cromosoma: 7q31
- Gene: 200 kb
- 27 esoni
- mRNA: 6129 bp
- Proteina: 1480 aminoacidi,

ATP binding sites
CFTR protein
NH_2
R
COOH
Hydrophobic transmembrane regions
Folding and insertion into membrane
Carbohydrate side chains
CFTR ion channel through membrane
Lipid bilayer of cell membrane
ATP binding sites
Transmembrane regions
CFTR protein
Hydrophobic transmembrane domains
ATP binding domain
ATP bin
domain
Regulatory domain

(http://www.cfgenetherapy.org.uk/cysticfibrosismore.htm; http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/CFgene.html)

FC e mutazioni

- note >1500 mutazioni; non tutte patologiche, di molte non si conosce il significato funzionale (alcune molto dubbie)
- Vario tipo: puntiformi, piccole del/ins, grossi riarrangiamenti
- Distribuzione geografica delle mutazioni (varie popolazione-specifiche)
- non identificato 100% mutazioni
- Poche decine di mutazioni frequenti:
  - F508del 35-90%
  - altre <20% circa;
  - >parte hanno freq. <1%

Distribuzione mutazioni FC

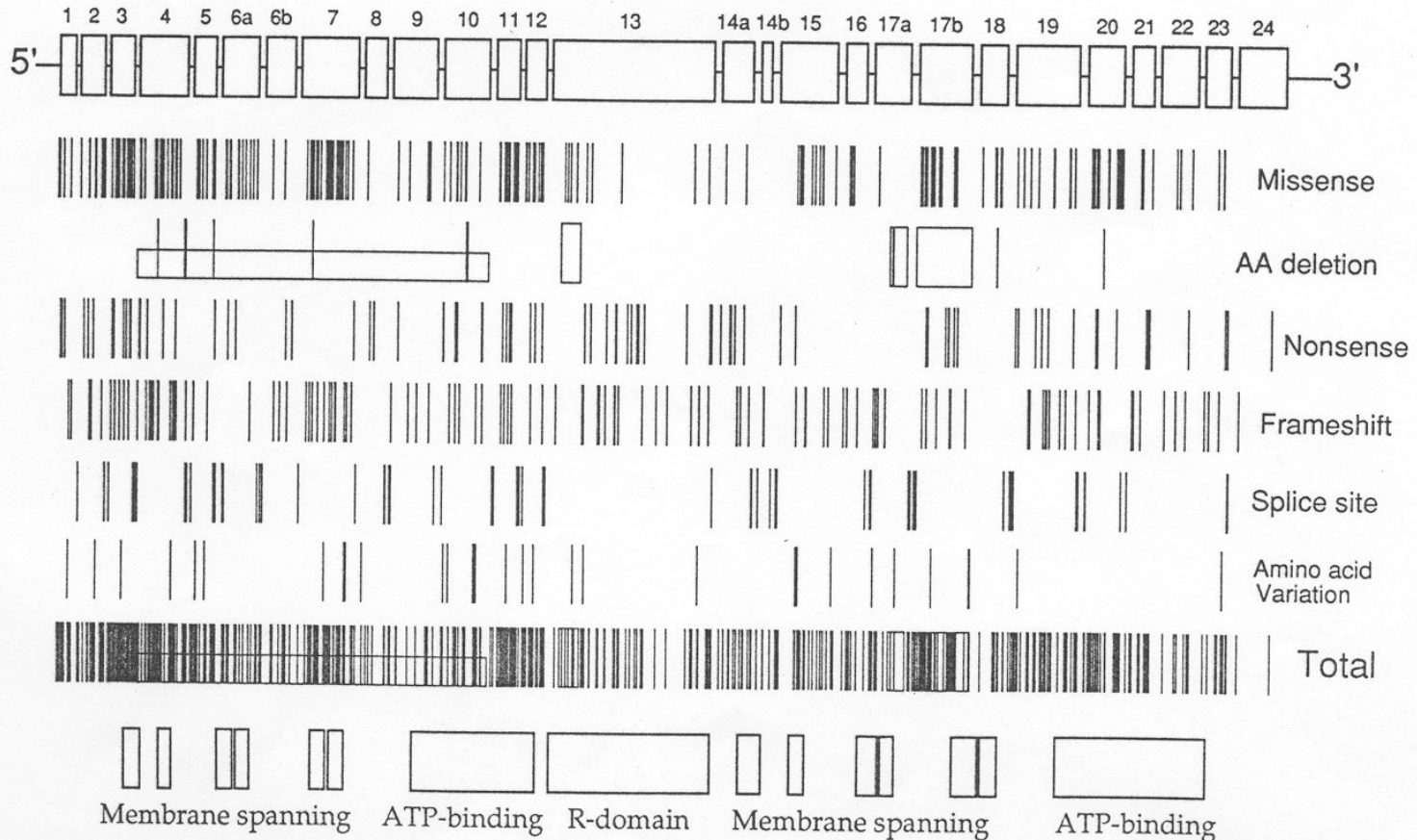
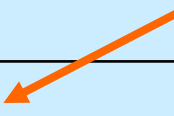



Figure 2 Distribution of mutations in the CFTRgene. The vertical lines indicate the locations of the different CFTR mutations (grouped in five categories: missense, amino acid deletion, nonsense, frameshift, and mRNA splicing mutation), with respect to the exons (*top*) and encoded protein domains (*bottom*). The locations of the benign (nonpathogenic) amino acid substitutions are also shown.

(Zielenski e Tsui, Ann Rev Genetics 29: 783, 1995).

Le mutazioni più frequenti della Fibrosi Cistica

	Mondo (%)	Italia (%)	Veneto (%)
ΔF508	67	51	48
G542X	3.4	4.8	2.7
G551D	2.4	0.08	0.4
W1282X	2.1	1.2	0.9
N1303K	1.8	4.8	4
R553X	1.3	1.1	1.3

CF Mutation Database: http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr

Mutazioni CF in Veneto e Trentino AA

Mutazione	Frequenza %	Freq. Cumulativa %
ΔF508	47,6	47,6
R1162X	9,8	57,3
2183AA->G	9,3	66,7
N1303K	4,0	70,7
G542X, 711+5G->A	2,7	76,0
1717-1G->A	2,2	78,2
G85E, R553X, altre2	1,3	83,6
Altre 5	0,9 e 0,4	86,7
Totale (16 mutazioni)		**86,7**

Hum. Genet. 1995; 95:397

Rischio residuo dopo analisi negativa di mutazione per Fibrosi Cistica

Mutazioni identificate (d)	Rischio di essere portatore ccr	Rischio di avere un figlio affetto; un genitore negativo ¼ ccr	Rischio di avere un figlio affetto; due genitori negativi (¼ ccr)^2
0	(1/26,5)	n.a.	(1/2705)
86,7%	1/193	1/772	1/148.996
95%	1/546	1/2.186	1/1.194.892
100%	0	0	0

ccr=2pq(1-d)/2pq(1-d)^2; (…) = dati screening neonatale Veneto-Trentino

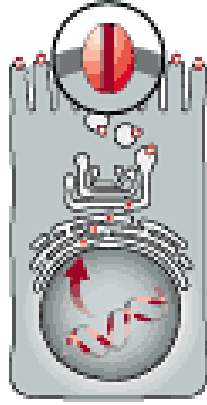
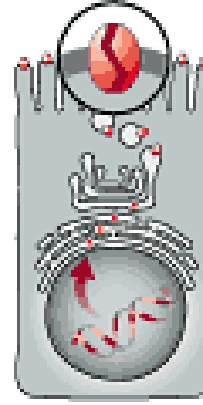
RISCHIO DI PORTATORE

Gruppo etnico*	Detection rate	Carrier Risk (NO test mut)	Carrier Risk (test mut neg**)
Ebrei-Ashkenazi	97%	1/29	1/930
Europei-caucasici	80%	1/29	1/140
Ispano-americani	57%	1/46	1/105
Afro-Americani	69%	1/65	1/207
Asiatico-americani	++	1/90	++

*POPOLAZIONE AMERICANA

**Pannello mutazioni consigliato da ACMG;
storia familiare negativa per CF

Identificazione delle coppie a rischio di Fibrosi Cistica con analisi di mutazioni

Mutazioni identificate (d)	due genitori con mutazione $(d)^2$	un genitore negativo $2d(1-d)$	due genitori negativi $(1-d)^2$
0	0	0	100%
70%	49%	42%	9%
86.7%	75.2%	23.0%	1.8%
95%	90.2%	9.5%	0.3%
100%	100%	0	0

Rischio di avere figli affetti

Gruppo etnico di entrambi i partner	NO TEST	P1 neg P2 no test	P1 pos P2 neg	P1 + P2 no test	Partners entrambi negativi
Ebrei-Ashkenazi	1/3.300	1/107.800	1/3720	1/116	1/3.459.600
Europei-caucasici	1/3.300	1/16.240	1/560	1/116	1/78.400
Ispano-americani	1/8.464	1/19.320	1/420	1/824	1/44.100
Afro-Americani	1/16.900	1/53.820	1/828	1/260	1/171.396
Asiatico-americani	1/32.400	++	++	1/360	++

Rischio figlio affetto = ¼ x rischio carrier P1 x rischio carrier P2

P1 e P2 carrier => rischio figlio affetto = 1/4

Classificazione delle mutazioni del gene della Fibrosi Cistica

Defect Classification	Normal	I	II	III	IV	V
Difetto risultante		**Sintesi Assente**	**Maturazione assente**	**Regolazione alterata**	**Conduzione alterata**	**Quantità ridotta**
Types of Mutation		Nonsense; Frameshift	Missense; Amino Acid Deletion (ΔF508)	Missense; Amino Acid Change (G551D)	Missense; Amino Acid Change (R117H) (R347P)	Missense; Amino Acid Change (A445E) Alternative Splicing

Le mutazioni della fibrosi cistica (gene CFTR) sono state suddivise in 5 classi in base al loro effetto funzionale (Modificato da Zielenski e Tsui, Ann Rev Genetics 29: 796, 1995).

Correlazione fra genotipo e funzionalità pancreatica esocrina

Funzione	Tipo di mutazioni	Esempi
Insufficienza	Grave/Grave	ΔF508 / ΔF508 ΔF508 / R1162X
Sufficienza	Grave/Lieve Lieve/Lieve	ΔF508 / R117H-5T 3849+10KbC-T / R334W

Mutazioni CFTR e CF

- I148T o 3199del6: qual è la vera mutazione?
- R117H-7T e R117H-5T
- Alleli complessi: F508del-R553Q

Note 75-95% mutazioni CF:
dove sono le altre mutazioni CF?

- mutazioni non identificabili con i metodi correnti (es. grossi riarrangiamenti)
- mutazioni in zone solitamente non indagate (introni, promotori)
- mutazione in zone di regolazione lontane dal gene (es. lattasi)
- altri meccanismi mutazionali (vedi caso mut. dinamiche)
- mutazioni apparentemente neutrali (ESE)

- altri geni?

CF-like disease in assenza di mutazioni CFTR

2 fam americane:

- fenotipo CF atipica (sudore elevato, sintomi polmonari)
- no segni CFTR non funzionante
- assenza mutazioni CFTR
- no linkage con CFTR (aplotipi diversi)

coppia fratelli tedeschi:

- fratello con sintomi CF-like (Cl- sudore elevato, sintomi polmonari, no segni CFTR non funzionante)
- sorella normale
- stesso genotipo CFTR e nessuna mutazione in entrambi

altri geni possono dare sintomi di CF?

Complessità in una malattia monogenica

La fibrosi cistica presenta un'ampia variabilità nella gravità dell’espressione clinica (configurazione, gravità, età di insorgenza) in particolare delle manifestazioni polmonari, anche tra pazienti con le stesse mutazioni CFTR o addirittura appartenenti alla stessa famiglia

Cosa può spiegare le modificazioni del fenotipo?

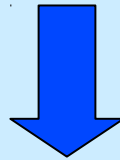
- eteogeneità allelica, ma solo parzialmente
- modulazione di un secondo sito nello stesso gene
  - F508del (grave); F508del-R553Q (gravità minore)
  - R117H-IVS8_5T (FC); R117H-IVS8_7T (nonFC)
- splicing alternativi o anomali
- altri meccanismi mutazionali
- controlli epigenetici

- Fattori ambientali (es. infezioni)

- Mutazioni in altri geni (Geni Modificatori)

Complessità in una malattia monogenica: Geni modificatori

- Impossibile predire fenotipo CF in base alle sole mutazioni CFTR
- Variabilità nella gravità dell'espressione clinica della malattia si ha anche tra pazienti con lo stesso genotipo CFTR o addirittura appartenenti alla stessa famiglia

↓

- Queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di altri geni che modulando l'espressione di CFTR o interferendo con percorsi metabolici comuni altererebbero il quadro clinico in FC

Gene CFTR + molti altri geni -> una malattia

Geni Candidati

·regolazione dell’equilibrio proteasi-antiproteasi e del rimodellamento tissutale

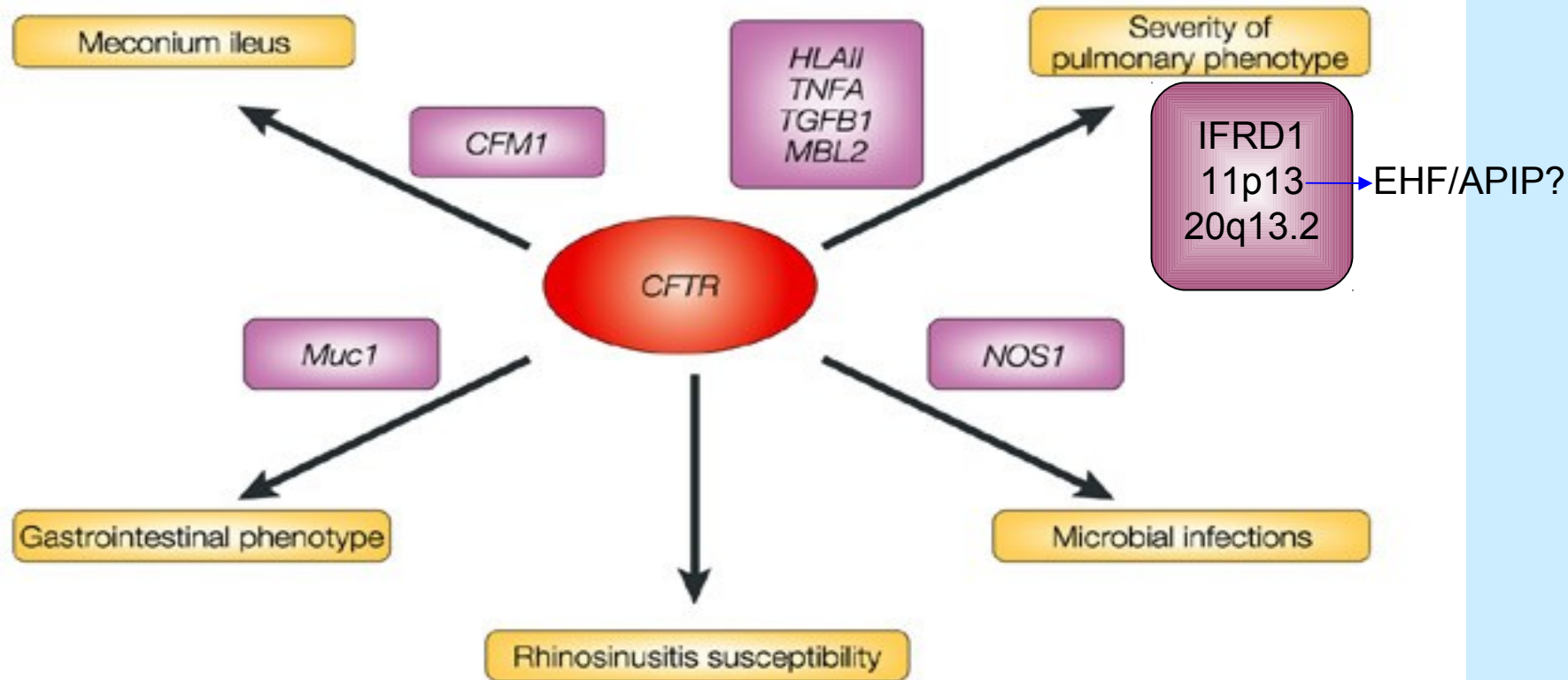
·difesa dell'ospite / infezioni

·infiammazione

·stress ossidativo e del metabolismo degli xenobiotici

·altri traportatori e proteine che interagiscono con CFTR (canali epiteliali del sodio, ENaC; canali del cloro, ORCC; scambiatore Na/H, NHE)

·controllo di espressione genica, processamento proteina, altri canali ionici epiteliali, controllo produzione muco, clearance mucociliare (es. chaperonine come HSP70, calnexina, CHIP, sembra partecipino attivamente a sintesi e degradazione di CFTR)

CF e geni modificatori

Studio dei geni modificatori con la stessa strategia usata per le malattie complesse → **GWAS**

Fenotipi CFTR-relati

un gene -> molte malattie

= entità cliniche associate a disfunzioni del gene CFTR, che tuttavia non soddisfano i criteri diagnostici standard per FC

organo colpito	polmone	pancreas	v. deferenti
CAVD / AZOOSPERMIA OSTRUTTIVA	-	-	+
PANCREATITE IDIOPATICA	-	+	-
BRONCHIETTASIE DIFFUSE	+	-	-

Complessità in una malattia monogenica: fenotipiCF-relati (CFTR-patie)

- CAVD (assenza congenita vasi deferenti)/azoospermia ostruttiva:
  - 80% almeno 1 mutazione
  - 50-60% 2 mutazioni

- pancreatite:
  - 30% almeno 1 mutazione
  - 10-15% 2 mutazioni

- bronchiettasie:
  - 10-50% almeno 1 mutazione

> mutazioni CF-lievi o non causa di CF; no mutazioni specifiche

un gene -> molte malattie

Trascritti CFTR e fenotipi correlati

(Estivill; Nat Genet 12:346; 1996)

nessun gene è un'isola

Malattie Genetiche